

УДК 579, 579.66, 663,574.3

## Экологическая оценка влияния на почву приоритетных загрязняющих веществ биотехнологических производств

© 2018 Н.Б. ГРАДОВА\*, Т.В. ГУСЕВА, А.В. МАЛКОВ, В.И. ПАНФИЛОВ

ФГБОУ Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, 125480

\*e-mail: gradova\_nb@mail.ru

Поступила 07.03.2018 г.

Принята в печать 20.04.2018 г.

Воздействие на почву микроорганизмов, используемых в ряде биотехнологических производств и являющихся индикаторами приоритетных загрязнений окружающей среды, исследовано на основе анализа результатов, полученных ранее (в 70–80-е годы) и в настоящей работе. Изучена скорость деградации приоритетных загрязняющих факторов ряда биотехнологических производств – инактивированной биомассы микроорганизмов *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Methylococcus capsulatus*, а также выделенных из почвы бактерий р. *Rhodococcus* и *Pseudomonas* – в четырех различных видах почвы. Показано, что эта скорость зависит от типа почвы и достигает наибольших значений в черноземной почве. Установлено, что в концентрации от 0,001 до 0,003 г/г почвы инактивированная биомасса и живые клетки указанных микроорганизмов оказывают стимулирующее действие на рост почвенного микробиоценоза – бактерий, грибов и актиномицетов. Показано, что протеолитическая активность почвы является информативным показателем различного уровня ее загрязнения инактивированной биомассой. В качестве лимитирующих для биодиагностики и биоиндикации загрязняющего биологического фактора установлены показатели фитотестирования и активности роста санитарно-показательных микроорганизмов – бактерий *E. coli*. Недействующей концентрацией инактивированной микробной биомассы определена концентрация 0,002 г/г почвы, действующей – 0,01 г/г почвы. В модельных опытах показана эффективность разработанной ранее системы импактного биологического мониторинга предприятий по производству биомассы углеводородокисляющих дрожжей, учитывающей розу ветров, расстояние переноса приоритетных загрязнений и использующей схему провоцирующих добавок в пределах действующей и недействующей концентрации биологического фактора для оценки воздействия на почву бактерий р. *Rhodococcus* и метанооксиляющих бактерий *Methylococcus capsulatus*.

**Ключевые слова:** биотехнологическое производство, микроорганизмы, инактивированная микробная биомасса, почва, биодиагностика, биоиндикация.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-3-59-66

Биотехнология является одним из инновационных научно-практических приоритетов XXI века. В промышленных биотехнологических процессах используется культивирование широкого круга микроорганизмов разного систематического положения. Обеспечение экологической безопасности развивающихся биотехнологических производств и применение биотехнологических продуктов и препаратов, полученных

с использованием живых или инактивированных клеток микроорганизмов, являются актуальной научно-практической задачей [1, 2].

Современные подходы к развитию экологического мониторинга (в том числе, импактного) как информационной системы наблюдений, оценки и прогноза изменений состояния окружающей среды основываются на принципе выбора приоритетных загрязняющих веществ<sup>1</sup>, т. е. соединений,

<sup>1</sup>Integrated Pollution Prevention and Control (IPPC). Reference Document on the Monitoring. IPPC Bureau, 2003. [http://eippcb.jrc.ec.europa.eu/reference/BREF/mon\\_bref\\_0703.pdf](http://eippcb.jrc.ec.europa.eu/reference/BREF/mon_bref_0703.pdf)

оказывающих наибольшее негативное воздействие на окружающую среду и являющихся специфичными для определенной отрасли<sup>2</sup> [3].

Биотехнологические производства являются источниками эмиссии специфического техногенного «биологического фактора»<sup>2</sup>, который может быть представлен биоаэрозолями, водными средами и твердыми отходами, содержащими живые или инактивированные клетки микроорганизмов, их экзометаболиты, ферменты, аминокислоты, продукты биосинтеза, выделяемые из биомассы при ее переработке и т. п. По составу биологический фактор представлен природными биоорганическими соединениями, которые тождественны продуктам, циркулирующим в биогеохимическом цикле углерода в природе, и увеличивают ресурс биоразлагаемых органических веществ. Это определяет как характер влияния биологического фактора на экосистемы, так и особенности методов биоиндикации (обнаружение компонентов биологического фактора в объектах окружающей среды), и биодиагностики (оценка их воздействия на окружающую среду) [4, 5]. В 80-е годы в соответствии с государственными программами были проведены широкие комплексные санитарно-гигиенические и экологические исследования биологического фактора действующих в нашей стране крупнотоннажных производств кормовой биомассы дрожжей на средах с н-парафинами. В качестве приоритетных загрязняющих веществ биологического фактора были определены живые и инактивированные клетки микроорганизмов<sup>2</sup> [6].

Одним из важнейших результатов медико-биологических, санитарно-гигиенических и экологических исследований, выполненных в 70–80-е годы, стало научное обоснование и практическое подтверждение возможной сенсibilизации человеческого организма в результате воздействия непатогенных живых и инактивированных клеток микроорганизмов. Гигиенические нормативы – предельно допустимые концентрации живых клеток дрожжей и бактерий, используемых для получения микробной биомассы и ферментов, в воздухе рабочей зоны – были установлены на уровне  $2 \cdot 10^3$ – $2 \cdot 10^4$  кл/м<sup>3</sup>. ПДК белка инактивированных клеток дрожжей *Candida maltosa* в воздухе рабо-

чей зоны и атмосферном воздухе установлены с пометкой «аллерген» на уровне соответственно 0,1 и 0,001 мг/м<sup>3</sup> специфического белка, определяемого методом реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) при использовании разработанного иммуноглобулинового эритроцитарного диагностикума [5, 6].

Почва чувствительна к техногенному воздействию, поэтому данные почвенного мониторинга в районе источников эмиссии являются высокоинформативным показателем не только масштаба экологического воздействия данного производства при регламентном режиме его работы, но и возможных техногенных рисков при аварийных ситуациях. Основная экологическая характеристика производственного углеводородокисляющего штамма живых клеток дрожжей *Candida maltosa* ВСБ-899 и их инактивированной биомассы была получена при лабораторных исследованиях и инвентаризации эмиссии пяти крупнотоннажных заводов по производству дрожжей из н-парафинов, расположенных в разных почвенно-климатических зонах и являющихся длительно (более 15 лет) действующими источниками выброса биологического фактора [7].

В результате проведенных исследований не было выявлено зависимости между удалением от источника эмиссии и встречаемостью дрожжей в почве, а также филосфере, ризосфере и ризоплане растений. Не было также отмечено тенденции к стабилизации численности в почве популяции углеводородокисляющих дрожжей *C. maltosa*, что определяет их как аллохтонную микрофлору [8]. Расчет<sup>3</sup> рассеивания техногенных выбросов показал, что основная масса частиц аэрозоля размером до 1 мкм, содержащего живые клетки дрожжей, оседает из воздуха на расстоянии около 500 м от источника выброса. В точке максимальной концентрации белковой пыли в атмосферном воздухе, которая составляет 0,002–0,08 мг/м<sup>3</sup> (зависит от мощности производства и технологии), ее содержание в поверхностном слое почвы определялось на расстоянии 1000–1500 м от источника. Если расчетное содержание белковой пыли не превышало 0,01 г/г почвы, ее концентрация в 10-сантиметровом слое почвы при этом составляла 0,001 – 0,005 г/г [9].

<sup>2</sup>Постановление Правительства Российской Федерации от 28 сентября 2015 г. № 1029 «Об утверждении критериев отнесения объектов, оказывающих негативное воздействие на окружающую среду, к объектам I, II, III и IV категорий».

<sup>3</sup>Методы расчетов рассеивания выбросов вредных (загрязняющих) веществ в атмосферном воздухе. Утверждены Приказом Министерства природных ресурсов и экологии Российской Федерации № 273 от 6 июня 2017 г.

В модельных опытах методом радиоактивных индикаторов был определен период полудеградации ( $T_{1/2}$ ) биомассы живых и инактивированных при термообработке клеток дрожжей *C. maltosa* в черноземной и подзолистой почве, равный соответственно 12 и 10 сут [10].

Установлен характер влияния на почвенный микробиоценоз инактивированной биомассы дрожжей в зависимости от ее концентрации. Показано, что стимулирующее действие биомасса дрожжей *C. maltosa* оказывала на рост почвенных бактерий, грибов и актиномицетов в концентрации 0,001–0,003 г/г почвы. При повышении концентрации до 0,005 г/г почвы наблюдалось угнетение роста бактерий, а при концентрации биомассы 0,1 г/г почвы – интенсивный рост плесневых грибов. По мере повышения концентрации вносимой в почву инактивированной биомассы дрожжей установлено ее стимулирующее воздействие на рост санитарно-показательных бактерий *E. coli* и снижение показателей фитотестирования, что, как предполагалось, было связано с повышением концентрации в почве токсических веществ, продуцируемых грибами, рост которых стимулировала биомасса инактивированных клеток микроорганизмов [7]. Недействующая концентрация инактивированной биомассы дрожжей при фитотестировании была определена равной 0,002 г/г почвы.

В результате фитотестирования и оценки активности санитарно-показательных бактерий *E. coli* в ранее проведенных исследованиях воздействия биологического фактора на почву [7] были установлены лимитирующие показатели вредности почвы: недействующая концентрация инактивированной микробной биомассы была определена на уровне 0,002 г/г почвы, а действующая – 0,01 г/г.

Экологическая оценка биологического фактора была получена при локальном почвенном мониторинге зон расположения биотехнологических заводов по производству дрожжей на н-парафинах. Мониторинг был основан на сравнительной оценке состояния почвенного биоценоза по экологическому профилю, проходящему через зону наибольшего загрязнения от источника эмиссии по направлению господствующих ветров [7]. Примененная система биомониторинга соответствует современному положению о возможности получения объективного представления о воздействии техногенных факторов на природные среды только на основе сравнительного этиологического анализа, включающего исследования на фоно-

вом или близком к фоновому уровне. Полученные при проведении мониторинга результаты позволили оценить способность почвы к самоочищению на разном удалении от источника эмиссии и точку контроля за состоянием почвы.

В настоящее время в биотехнологических процессах используется широкий круг микроорганизмов: дрожжи *Yarrowya lipolytica*, *Candida utilis*, *S. cerevisiae* и др. при переработке целлюлозосодержащего сырья и зерна и при получении биоэтанола; бактерии преимущественно р. *Rhodococcus* и *Pseudomonas* при производстве препаратов для биоремедиации нефтезагрязненных почв и метанооксиляющие бактерии при разработке технологии получения микробной биомассы на основе природного газа.

Цель настоящей работы – экологическая оценка воздействия на почву приоритетных загрязнений биотехнологических процессов и производств, разрабатываемых и применяемых в настоящее время, а также сравнение результатов, полученных в данной работе и ранее при оценке в качестве контаминантов живых клеток и инактивированной биомассы углеводородоксиляющих дрожжей.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объектов исследований использовали штаммы дрожжей *Yarrowya lipolytica* ВКМ 2378, *Candida utilis* ВСБ-651, а также метанооксиляющие бактерии *Methylococcus capsulatus* ВСБ-874 из коллекции кафедры биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева. Кроме того, использовали бактерии р. *Rhodococcus* и *Pseudomonas*, выделенные при температуре 30–35 °С стандартным методом накопительных культур из 5 г почвенных образцов в колбах емкостью 750 мл с 100 мл минеральной среды, содержащей 2 мл фракции н-парафинов C<sub>10</sub>–C<sub>21</sub>. в качестве источника углерода, при рН 6,8–7,0. Выделенные штаммы бактерий идентифицировали на основании их фенотипических признаков (определитель бактерий Берджи, URSS.ru 1994) и используя метод 16S рРНК.

Характер воздействия на почвенный биоценоз живых и термически инактивированных клеток микроорганизмов изучали в модельных опытах в чашках Петри.

Для исследования отбирали верхние горизонты (0–15 см) почв различных почвенно-климатических зон: подзолистые суглинистые (Московская обл., содержание общего азота 0,08%); черноземы (Воронежская обл., 0,2%); каштановые

(Волгоградская обл., 0,115%) и сероземы (Астраханская обл., 0,07%). Воздушно-сухую почву просеивали и использовали фракцию диаметром менее 2 мм.

Для оценки экологических свойств микроорганизмов использовали рекомендации по изучению почвенных микробсообществ *in situ* [10], а также учитывали результаты, полученные ранее при изучении экологических характеристик живых и инактивированных клеток дрожжей *S. maltosa* ВСБ-899 [5, 6]. Культуры микроорганизмов выращивали в периодическом процессе в колбах в шейкере-инкубаторе (120 об/мин) при рН 6,8–7,0 и температуре 30–35 °С. В начале стационарной фазы клетки отделяли от культуральной жидкости и готовили суспензию разных культур равной плотности. Живые клетки инактивировали на водяной бане при температуре 90 °С в течение 10 мин. Выживаемость определяли посевом на агаризованную среду.

Для оценки биоремедиационной активности в чашки Петри вносили 50 г почвы и определенное (в зависимости от эксперимента) количество живых клеток или инактивированной биомассы. Чашки инкубировали при температуре 20–25 °С при увлажнении почвы около 60%. Активность деградации микробной биомассы определяли по дыхательной активности почвы классическим методом в аппарате Варбурга. Содержание в почве основных групп сапрофитных микроорганизмов определяли стандартными методами при посеве на агаризованную среду Чапека (для грибов), мясо-пептонный агар и казеин-глицериновый агар (для бактерий и актиномицетов). В качестве санитарно-показательных микроорганизмов использовали бактерии *E. coli* М-17 (коллекция Института экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.М. Сысина).

Фитотестирование и тест с использованием штамма *E. coli* проводили при использовании стандартных методов [11].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные эксперименты показали, что скорость биодegradации в почве биомассы живых клеток и инактивированной биомассы дрожжей и бактерий зависит от свойств почвы. Показатели скорости деградации в почве живых клеток и инактивированной биомассы дрожжей *Candida utilis*, *Yarrowya lipolytica* и *Saccharomyces cerevisiae* оказались сходными с величиной, определенной ранее для дрожжей *Candida maltosa* [7].

При этом в черноземной почве время полудegradации инактивированной биомассы дрожжей была выше, чем в подзолисто-суглинистой, и составляла соответственно 8–10 сут и 15 сут. Наибольшая скорость деградации инактивированной биомассы метанооксиляющих бактерий *Methylococcus capsulatus* при начальной концентрации 0,025 г/г почвы также наблюдалась в черноземной почве (рис. 1).

Скорость деградации инактивированной биомассы бактерий р. *Rhodococcus*, *Pseudomonas* и метанооксиляющих бактерий р. *Methylococcus* была ниже таковой для дрожжей – соответственно 15 и 20 сут. [5, 7]. Показано, что скорость разрушения инактивированной биомассы изучаемых дрожжей и бактерий выше, чем живых клеток, что подтверждает ранее полученные данные [7, 10]. Это определяется частичным разрушением микробных клеток при их термической инактивации, увеличением содержания пептидов, аминокислот в биомассе и повышением ее трофической доступности для почвенных микроорганизмов [12].

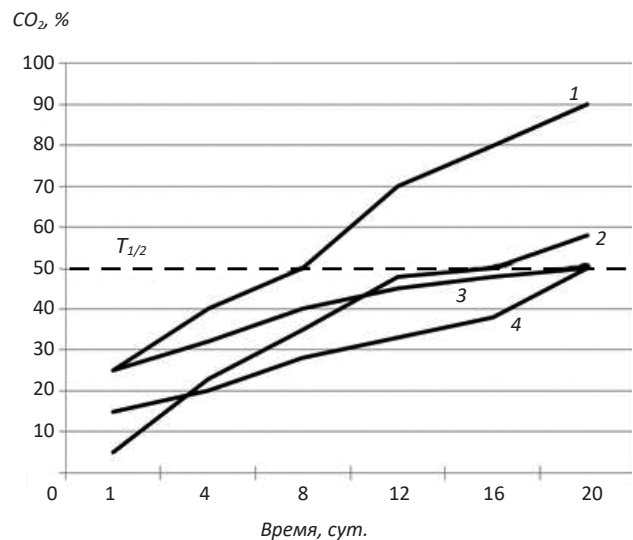


Рис. 1. Скорость деградации инактивированной биомассы бактерий *Methylococcus capsulatus* в различных типах почвы: 1 – чернозем, 2 – каштановая, 3 – подзолисто-суглинистая, и 4 – серозем.  $T_{1/2}$  – период полудegradации биомассы живых и инактивированных клеток дрожжей *S. maltosa* в черноземной и подзолистой почве [10]

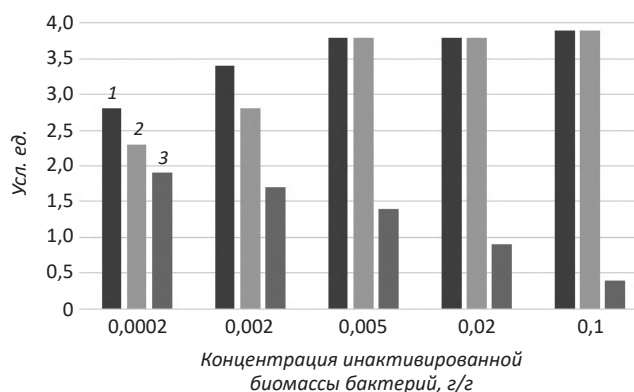
Fig. 1. Rate of degradation of inactivated biomass of *Methylococcus capsulatus* bacteria in various types of soil: (1), chernozem (2), chestnut (3), podzolic-loamy and (4), and serozem.  $T_{1/2}$  is half-degradation period of live and inactivated *C. maltosa* cells in chernozem and podzolic soil [10]

При исследовании воздействия биомассы изучаемых микроорганизмов *Y. lipolytica*, *S. cerevisiae*, *M. capsulatus*, а также выделенных из почвы бактерий р. *Rhodococcus* и *Pseudomonas* в концентрации от 0,001 до 0,003 г/г почвы показано, что инактивированная биомасса и живые клетки оказывали стимулирующее действие на рост почвенного микробиоценоза – бактерий, грибов и актиномицетов. При этом эффект инактивированных клеток был на 10–12% выше, чем живых (данные не приведены).

При повышении концентрации вносимой инактивированной биомассы до 0,005 г/г почвы отмечалось некоторое угнетение роста почвенных бактерий и активный рост плесневых грибов и актиномицетов, который сохранялся и при концентрации биомассы 0,1 г/г почвы (рис. 2). При этом было показано, что данные грибы не были внесены в почву с биомассой, а являлись аборигенной почвенной микрофлорой. Только при экстремальных концентрациях, характеризующих аварийную ситуацию, микробная биомасса оказывала угнетающее действие на рост актиномицетов и грибов.

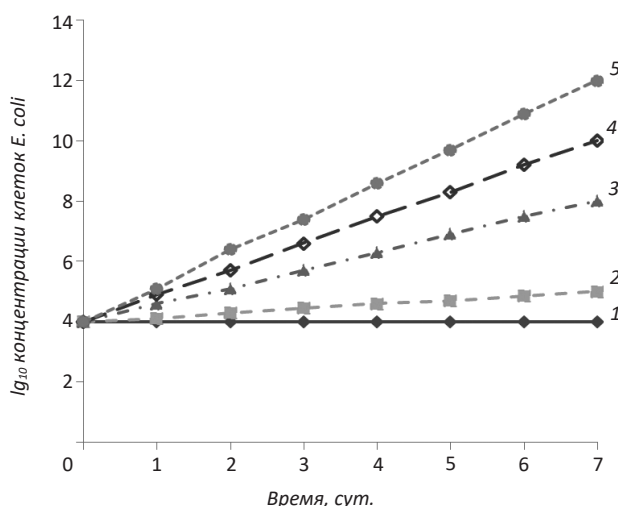
Исследование показало, что протеолитическая активность почвы является информативным показателем различного уровня загрязнения инактивированной биомассой (см. рис. 2).

Определение влияния привнесенной микробной инактивированной бактериальной биомассы



**Рис. 2.** Влияние концентрации инактивированной биомассы бактерий *Methylococcus capsulatus* на состав почвенного биоценоза и ферментативную активность почвы: 1 – протеолитическая активность; 2 – концентрация грибов и актиномицетов; 3 – концентрация бактерий

**Fig. 2.** Effect of concentration of *Methylococcus capsulatus* bacteria inactivated biomass on composition of soil biocenosis and its enzymatic activity: (1), proteolytic activity; (2), concentration of fungi and actinomycetes; and (3), concentration of bacteria



**Рис. 3.** Влияние уровня загрязнения почвы инактивированной биомассой бактерий *Methylococcus capsulatus* на рост бактерий *E. coli*. Содержание инактивированной биомассы в почве, г/г: 1 – контроль (исходная незагрязненная почва); 2 – 0,001; 3 – 0,01; 4 – 0,02; 5 – 0,1

**Fig. 3.** Effect of soil contamination by *Methylococcus capsulatus* bacteria inactivated biomass on *E. coli* bacteria growth. Content of inactivated biomass, g/g soil: (1), control (without contamination); (2), 0.001; (3), 0.01; (4), 0.02; and (5), 0.1

на почвенные микроорганизмы *Arthrobacter* sp, *Rhodococcus luteus*, *R. terrae* и *R. erythropolis* показало их разную чувствительность к данному фактору. Наиболее устойчивыми оказались представители р. *Rhodococcus* и среди них штамм *R. erythropolis*. Рост бактерий *Arthrobacter* sp. подавлялся инактивированной биомассой при концентрации 0,005 г/г почвы, а рост *R. erythropolis* – при концентрации 0,01 г/г. [8].

В ранее проведенных исследованиях лимитирующим показателем влияния инактивированной биомассы дрожжей *C. maltosa* на почву было определено снижение активности процессов самоочищения почвы от патогенной микрофлоры [14]. В данных исследованиях при внесении в почву инактивированной биомассы изучаемых штаммов дрожжей и бактерий также наблюдалась положительная зависимость роста бактерий *E. coli* от концентрации внесенной в почву биомассы (рис. 3). При этом отмечено, что биомасса дрожжей обладала большим стимулирующим воздействием на рост бактерий *E. coli*, чем биомасса метанокисляющих бактерий р. *Methylococcus* (данные не приведены).

При исследовании влияния концентрации бактериальной биомассы на важнейший показатель токсикологической оценки почвы – результаты

Таблица 1

**Влияние концентрации инактивированной микробной биомассы, внесенной в различные виды почвы, на прорастание семян пшеницы, % от контроля**

**Effect of concentration of inactivated biomass introduced in various soils on wheat seed germination, % of control**

Инактивированная биомасса микроорганизма	Прорастание семян (%) при концентрации загрязнения, г/г почвы				
	0,0002	0,001	0,002	0,02	0,1
<i>Yarrowia lipolytica</i>	97/98*	67/78	72/81	19/40	Рост отсутствует
<i>Rhodococcus erythropolis</i> и <i>Pseudomonas</i> sp.(1:1)	87/94	57/68	73/79	19/24	То же
<i>Methylococcus capsulatus</i>	97/98	65/70	82/85	21/39	» »

\*Подзолисто-суглинистая почва/чернозем.

фитотестирования [11] – выявлены закономерности, аналогичные полученным ранее при исследовании инактивированной биомассы дрожжей [7, 8]. Биомасса бактерий в низких концентрациях практически не оказывала влияния на прорастание семян пшеницы, а в высоких – снижала активность этого процесса (табл. 1). По данным табл. 1, в качестве действующей концентрации инактивированной биомассы дрожжей и бактерий при фитотестировании определена величина 0,002 г/г почвы.

Использование фитотестирования позволяет оценить функциональную активность почвенного микробиоценоза. При этом следует учитывать, что на прорастание семян растений оказывают влияние не только добавляемый биологический фактор, но и возможные изменения соотношения азота и фосфора в почве, возникающие при внесении этих компонентов с исследуемым техногенным фактором (табл. 2).

Итак, проведенные исследования показали, что экологическая характеристика инактивированной биомассы микроорганизмов разных родов

и видов изученных штаммов дрожжей и бактерий практически аналогична полученной ранее характеристике дрожжей *C. maltosa*.

Таким образом, в качестве лимитирующих показателей при биодиагностике и биоиндикации воздействия биологического фактора на почву определены показатели интегральной диагностической системы оценки загрязнения почвы техногенными факторами, а именно, фитотестирование и содержание санитарно-показательных бактерий *E. coli*

Недействующая концентрация биологического фактора микробной биомассы изученных дрожжей и бактерий определена на уровне 0,002 г/г почвы, а действующая концентрация – 0,01 г/г, что соответствует ранее полученным результатам [7, 8].

Ранее в модельных опытах была апробирована система импактного мониторинга, основанная на сравнительной оценке состояния почвенного биоценоза, показателей лимитирующих факторов по экологическому профилю, проходящему через зону наибольшего загрязнения

Таблица 2

**Влияние концентрации вносимой в почву инактивированной биомассы метанооксилирующих бактерий на химические свойства подзолисто-суглинистой почвы**

**Effect of concentration of introduced methane-oxidizing bacteria inactivated biomass on chemical properties of sod-podzolic-loamy soil**

Химическая характеристика почвы	Концентрация вносимой биомассы, г/г почвы			
	К	0,002	0,02	0,10
pH	5,60	5,50	5,20	5,00
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , г/100 г	0,28	0,28	0,62	1,50
Общий азот, г/100 г	0,015	0,01	0,17	0,67
Соотношение N:P	0,05	0,05	0,27	0,44

Примечание: К – контроль (исходная незагрязненная почва).

**Фитотест (модельный биомониторинг) подзолисто-суглинистой почвы, загрязненной инактивированной биомассой метанооксиляющих бактерий, с последующим внесением в нее функциональной добавки**

**Effect of phytotesting (model monitoring) of introduction in podzolic-loamy soil of inactivated biomass of methane-oxidizing bacteria followed by repeated (provoking) addition**

Концентрация инактивированной биомассы, г/г почвы	Данные фитотеста (%) при внесении функциональной добавки, г/г почвы		
	0,00	0,002	0,01
0,003	100	-	20
0,002	» »	24	-
0,001	» »	-	98
0,0002	» »	100	-

Примечание: показатели фитотеста без внесения функциональной добавки приняты за 100%.

от источника эмиссии по направлению господствующих ветров [7]. Использование в данной системе в качестве контрольной точки почвы, не отличающейся по лимитирующим показателям от исходной, соответствует современным требованиям об обязательном мониторинге эталонного участка, который имеет аналогичные исследуемому природные особенности и у которого отсутствуют признаки угнетения естественной экологической системы [3].

В модельных лабораторных опытах был использован метод провоцирующих (функциональных) добавок. В подзолисто-суглинистую почву вносили инактивированную биомассу метанооксиляющих бактерий в концентрации от 0,0002 до 0,003 г/г почвы. При этом не было выявлено различий между показателями биотестирования почв в данных вариантах опыта после трех суток экспозиции при температуре 20–22 °С и влажности почвы 25–30%. Затем в почву дополнительно вносили функциональную добавку (инактивированную биомассу метанооксиляющих бактерий) в количествах, соответствующих величинам действующей и недействующей концентрации (соответственно 0,01 и 0,002 г/г почвы). В результате внесения указанной добавки показатели фитотестирования при максимальной концентрации загрязнения снижались до 20% от контроля, при концентрации инактивированной биомассы 0,002 г/г – до 24%, в то время как в контрольной точке показатели фитотестирования не изменялись (табл. 3). Проведенные исследования показали эффективность применения метода функциональных добавок при локальном мониторинге для определения зоны максимального загрязнения почвы и определения точки экологического риска.

Таким образом, полученные результаты подтверждают эффективность разработанной системы локального мониторинга биотехнологических производств, использующих культивирование микроорганизмов в аэробных условиях, на основе анализа почвы по экологическому профилю, проведенного от источника по направлению господствующих ветров при использовании метода функциональных (провоцирующих) добавок.

Полученные результаты должны учитываться при разработке биотехнологических процессов, включающих культивирование микроорганизмов и предусматривающих внесение в почву микробной биомассы и органических субстратов.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Тарасова Н.П., Анохина Н.П., Малков А.В. Сегаль М.Г. К вопросу об оценке потенциальной опасности химико-технологического объекта. *Хим. пром.*, 1994, (6), 368–372.
2. Guseva T., Begak M., Molchanova Ya., Vartanyan M., and Zhukov D. Improving environmental Self-monitoring practices of Russian industries: Proc.16-th International Multidisciplinary Scientific Geo Conference, *SGEM*. 2016, 5, (1), 367–374. doi: 10.5593/SGEM2016/B51/S20.049
3. Гусева Т.В., Бегак М.В., Молчанова Я.П., Макеенко П.А. Существенные и маркерные показатели в экологическом нормировании на основе наилучших доступных технологий и оценке экологической результативности предприятий I категории. Наилучшие доступные технологии. Применение в различных отраслях промышленности. М.: Перо, 2016, (5), 4–19.
4. Градова Н.Б., Панфилов В.И. Биологический техногенный фактор биотехнологических производств. *Актуальная биотехнология*, 2015, 3(14), 64.

5. Градова Н.Б. Биодиагностика биологической безопасности биотехнологических производств для окружающей среды: Материалы Международной конференции «Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред». М.: Изд-во МГУ, 2013, 52.
6. Градова Н. Б., Далин М. В., Ермолаев А. В., Яшина Н. В. Санитарно-гигиеническая безопасность биотехнологических производств. Химическая и биологическая безопасность: Сб. научных трудов. М.: РХТУ, 2011, 149–166.
7. Градова Н.Б., Мякшина И.В., Белов А. П., и др. Разработка и апробация системы почвенно-биологического мониторинга биотехнологических производств. *Биотехнология*, 1996. (9), 38–44.
8. Кожевин П.А., Кочкина Г.А., Кирилова Н.П. и др. Загрязнение почв дрожжами р. *Candida*. *Почвоведение*, 1982, (11), 67–71.
9. Ковальский Ю. В., Градова Н. Б. Импактный мониторинг биоаэрозолей биотехнологических производств. *Аэрозоль*, 1989, 8 (4), 177–178.
10. Градова Н. Б., Белов А. П., Кожевин П. А., Мякшина И. В. Выбор индикаторных биосистем при оценке воздействия биотехнологических производств на почву. *Биотехнология*, 1994, (9–10), 34–38.
11. Гончарук Е.И, Сидоренко Г.И. Гигиеническое нормирование химических веществ в почве. М.: Медицина, 1986, 320.
12. Гусельникова Т.В., Павлов А.А., Безруков М. Г., Градова Н. Б. Влияние термообработки на фракционный состав белков дрожжей. *Биотехнология*, 1988, (4), 509–511.
13. Кожевин П.А. Микробные популяции в природе. М.: МГУ, 1989, 170 с.

## Environmental Assessment of Impact on Soil of Priority Pollutants of Biotechnological Productions

N.B. GRADOVA\*, T.V. GUSEVA, A.V. MALKOV, and V.I. PANFILOV

*Mendeleev Russian University of Chemical Technology, 125480, Moscow Russia*

\*e-mail: gradova\_nb@mail.ru

Received March 7, 2018

Accepted April 20, 2018

**Abstract**—Based on the earlier (70-ies and 80-ies) and current results, the effects on soil of microorganisms used in biotechnological processes that are indicator parameters of the emission of priority soil pollutants, have been assessed. The rate of degradation of live and inactivated biomass of *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Methylococcus capsulatus*, and also soil-isolated bacteria of the *Rhodococcus* and *Pseudomonas* genera in four different soil types has been investigated. It was shown that this rate depended on type of soil and it was maximal in chernozem. It was established that the inactivated biomass and live cells of the above microorganisms in concentrations from 0.001 to 0,003 g/g soil stimulated the growth of the soil biocenosis, bacteria, fungi and actinomycetes. The soil proteolytic activity was shown to be an informative index of various levels of its contamination with the inactivated biomass. Phytotesting and growth activity of sanitary-indicative *E. coli* bacteria were determined as limiting parameters for biodiagnostics and bioindication of the biological contaminating factor. The concentrations of 0.002 g/g and 0.01 g/g soil were shown to be the inactive and active concentration, respectively, of the inactivated microbial biomass. The efficacy of the previously developed system of impact biological monitoring of processes connected with the production of hydrocarbon-oxidizing yeast was demonstrated in model experiments. This system takes into account the rose of wind, transfer distance of priority pollutants and uses a scheme of provoking additives within the framework of active and inactive concentrations of the biological factor to assess the effect on soil of the *Rhodococcus* genus bacteria and methane-oxidizing bacteria of *Methylococcus capsulatus*.

**Key words:** biotechnological production, microorganisms, inactivated microbial biomass, soil, biodiagnostics, bioindication.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-3-59-66